

# INSÉMINATION ARTIFICIELLE DANS L'ESPÈCE CANINE : ACTUALITÉS

## ARTIFICIAL INSEMINATION IN DOGS: WHAT'S NEW

Par Christian DUMON<sup>(1)</sup>

(communication présentée le 25 janvier 2007)

### RÉSUMÉ

L'intérêt croissant porté par les cynophiles et les éleveurs de chiens aux techniques de reproduction assistée est directement lié aux bons résultats que l'on peut actuellement en attendre. Ceux-ci ont été améliorés de façon progressive et constante au cours des vingt dernières années, grâce à une meilleure connaissance de la physiologie sexuelle de l'espèce et à de meilleures possibilités d'exploration sémiologique de l'appareil génital mâle et femelle par les dosages hormonaux, l'échographie, et la fibroscopie.

En associant rétrospective et situation actuelle, cet article se propose de préciser les indications, la réalisation, les résultats et les limites de chacune des trois techniques d'insémination pratiquées dans l'espèce canine : insémination de semence fraîche, réfrigérée ou congelée.

Les perspectives d'avenir sont également évoquées.

**Mots-clés :** semence fraîche, réfrigérée ou congelée, détermination du moment de l'ovulation, fertilité, insémination intra-vaginale et intra-utérine.

### SUMMARY

*The growing interest of dog breeders and dog owners for assisted reproduction techniques is fuelled by its good results. The outcome of the procedures has improved consistently over the past twenty years, based on more detailed understanding of canine reproductive physiology and improved clinical investigations of the male and female genital tract using hormone assays, ultrasound examinations, and fibroscopy.*

*This article reviews past and current data, describing the indications, implementation, results and limits of the three insemination techniques used in dogs, i.e. with fresh, chilled or frozen semen. Future prospects are also described.*

**Key words :** fresh, chilled and frozen semen, ovulation timing, fertility, vaginal and intrauterine insemination.

(1) 161, Chemin des Plateaux, 78520 Saint Martin La Garenne

Il y a environ trente ans, l'activité du vétérinaire en matière de reproduction canine était avant tout orientée vers la limitation de la fertilité, voire sa suppression. Puis très rapidement, l'intérêt sans cesse croissant des propriétaires de chiens pour la cynophilie, la multiplication des élevages canins, la valeur économique des chiens « de race » ont totalement inversé la tendance. Une frange de plus en plus importante de la clientèle a souhaité faire reproduire dans les meilleures conditions possibles ses trois ou quatre champions d'exposition ou avec une rentabilité maximum, les nombreuses chiennes de son élevage professionnel. Les techniques de reproduction assistée, plus particulièrement d'insémination artificielle, ont tout naturellement vu le jour et se sont développées pour répondre à cette demande.

Après avoir été impliqué dans leur développement dès leur apparition et en avoir fait l'essentiel de notre activité de recherche clinique, nous pensons disposer aujourd'hui du recul nécessaire et suffisant pour en présenter les acquis, sachant que des progrès seront sans aucun doute réalisés dans un avenir proche.

En élevage d'animaux de rente, l'insémination artificielle (IA) est toujours réalisée à partir de semence congelée, prélevée chez des géniteurs sélectionnés dans un souci d'amélioration génétique et de rentabilité économique.

Dans l'espèce canine, il convient par contre de distinguer l'IA avec de la semence fraîche, réfrigérée ou congelée, chacune ayant ses indications, ses contraintes techniques, des résultats différents.

## INSÉMINATION DE SEMENCE FRAÎCHE

### Définition

L'insémination artificielle de semence fraîche consiste à remplacer la saillie naturelle par la mise en place, dans le tractus génital de la chienne, de la semence immédiatement après son prélèvement chez le mâle.

### Indications

Les deux indications en sont :

- **le refus de la saillie** par l'un ou l'autre des partenaires que l'on a mis en présence pour un accouplement programmé. Il est parfois lié à une anomalie congénitale ou à un problème pathologique affectant les organes génitaux de l'un des deux protagonistes ; plus souvent, il est la conséquence d'un mauvais choix de la date fixée par les maîtres pour la saillie naturelle (chienne encore en proœstrus ou déjà en metœstrus) ou d'une socialisation intra-spécifique défectueuse (chienne « dominante » et agressive avec ses congénères ou au contraire, « dominée » et craintive). L'IA avec de la semence fraîche permet alors de remplacer l'accouplement ;

- **la protection de l'étalon contre des affections à transmission vénérienne** ; la prévalence de ces maladies, qui peuvent com-

promettre tout un élevage, ne cesse d'augmenter et certains propriétaires refusent que leur étalon de valeur pratique la saillie naturelle et demandent qu'il soit utilisé pour l'insémination artificielle.

### Réalisation

Trois étapes successives doivent être impérativement respectées :

- la détermination du moment de l'ovulation de la chienne,
- le prélèvement et surtout l'examen de la semence du mâle,
- la mise en place de la semence dans le tractus génital de la femelle.

### Détermination du moment de l'ovulation

#### Le problème

Pendant toute la durée des chaleurs, la chienne n'est fécondable que pendant deux jours. Lors de l'ovulation, la rupture des follicules de de Graaf libère des ovocytes immatures qui ne seront fécondables qu'après deux jours de maturation dans les oviductes. Cela se produit, pour la majorité des chiennes, entre le dixième et le quatorzième jour des chaleurs mais pour 25 à 30 % d'entre elles, entre le sixième et le dixième jour ou parfois le vingtième. (Concannon *et al.* 1983 ; Dumon 1992a ; Linde-Forsberg & Linde-Forsberg, 1993).

Les spermatozoïdes n'étant fécondants que pendant 4 à 7 jours selon l'âge de l'étalon, il est donc indispensable d'être précis quant à la détermination du moment de l'ovulation si on veut obtenir une synchronisation parfaite entre la fécondabilité de la femelle et l'efficacité des gamètes mâles (Concannon *et al.* 1989).

#### La solution

L'observation de la kératinisation des cellules vaginales à partir de frottis vaginaux a été pendant longtemps la seule méthode à la disposition des praticiens, pour déterminer la période de l'œstrus au cours de laquelle a lieu l'ovulation (Dumon 1992b). Mais la précision est insuffisante car, établie sur l'identification de la kératinisation, la durée de l'œstrus peut varier de un à dix jours. Pour compenser cette approximation, il fallait alors renouveler les inséminations tous les trois jours et ce n'était pas toujours possible (éloignement des partenaires, acceptation d'une seule IA par le propriétaire de l'étalon, etc...)

Or la chienne présente une particularité physiologique : la lutéinisation pré-ovulatoire. Contrairement à ce que l'on observe chez les autres femelles de mammifères, la progestéronémie augmente avant l'ovulation et elle atteint 5 à 8 ng/ml au moment où celle-ci se produit. Les travaux de recherche ont mis à profit cette particularité pour détecter avec précision le moment de l'ovulation lors du « suivi des chaleurs » (Mialot & Guérin, 1983 ; Jeffcoate & Lindsay, 1989 ; Fontbonne 1992a). La progestérone sanguine dont la concentration est inférieure à 2 ng/ml au début des chaleurs, augmente progressivement et la chienne est inséminée deux jours après que la concentration compatible avec l'ovulation a été atteinte, pour tenir compte de la maturation des ovocytes.

Le protocole associant la réalisation de frottis vaginaux jusqu'à l'observation de la kératinisation, à l'évaluation de la progestéronémie, a considérablement amélioré les résultats obtenus par IA avec la semence fraîche. Deux ou trois prises de sang, plus rarement quatre, réalisées à 48 h d'intervalle permettent de suivre la cinétique de la progestéronémie et de détecter la valeur signal.

### Récolte et examen de la semence

(Fontbonne & Dumon, 1992)

L'éjaculation est obtenue par massage du pénis au niveau des bulbes érectiles. Elle se décompose en trois phases (*tableau 1*) caractérisées par la composition des différentes fractions : la fraction urétrale ou « pré-sperme » est sans intérêt, la fraction épидидymaire contient pratiquement la totalité des spermatozoïdes et la fraction prostatique ou « post-sperme », la plus importante en volume, favorise leur migration et plus particulièrement leur franchissement du col utérin.

L'examen microscopique de l'éjaculat, indispensable, permet de déterminer la concentration des spermatozoïdes, d'apprécier leur mobilité, de dénombrer le pourcentage de formes anormales, lorsqu'elles existent.

Dans le cas des IA avec la semence fraîche, cet examen a exclusivement une valeur pronostique sur le résultat de l'intervention car les éleveurs ont choisi les reproducteurs et ne changeront pas d'étalon, même si son sperme est de qualité médiocre, à moins qu'il ne présente une azoospermie absolue.

### Mise en place de la semence

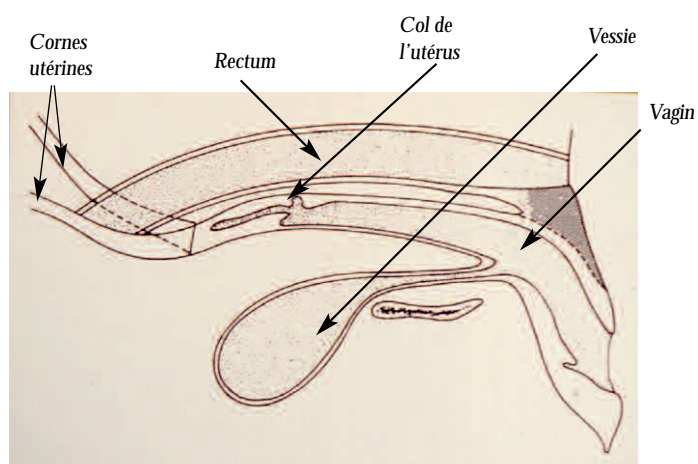
La voie intra-vaginale a été pendant longtemps la seule utilisée car le col utérin de la chienne était considéré comme « infranchissable ». Depuis que l'on a surmonté cette difficulté, comme nous le verrons ultérieurement, certains spécialistes préconisent la voie intra-utérine en s'appuyant sur les résultats comparés du pourcentage de gestation et de la prolificité dans les deux méthodes

Origine	Aspect	Obtention	Volume	Nb SP / ml
Pré-sperme urètre	Glaireux blanchâtre	30 à 50 sec.	0,2-2 ml	# 3M
Sperme épидидyme	Laiteux Aqueux	2 à 3 min.	0,5-5 ml	400 M
Post-sperme Prostate	Clair Visqueux	5 à 7 min.	5-50 ml	rare
Éjaculat Complet	Visqueux blanchâtre	7 à 10 min.	4-50 ml	# 400 M

**Tableau 1 :** Caractéristiques des trois fractions composant un éjaculat : on remarquera la seconde fraction riche en spermatozoïdes (SP) et la troisième essentiellement constituée des produits de sécrétion prostatiques.

Nous considérons pour notre part que l'on peut obtenir des résultats excellents lors des inséminations par voie intra-vaginale. Elle est plus facilement praticable par la majorité des praticiens et beaucoup moins onéreuse pour l'éleveur. Il convient d'éviter le reflux de la semence, favorisée par la particularité anatomique du vagin de la chienne, dont la moitié antérieure est horizontale et la moitié postérieure, verticale. Lors de la saillie naturelle, l'augmentation de volume des bulbes érectiles du pénis du chien, responsable de l'accolement prolongé des partenaires, permet d'éviter naturellement ce reflux. (*figures 1 a, b*).

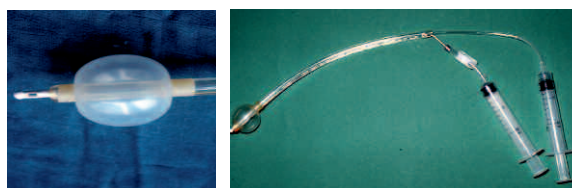
Dans le cas des IA, il faut surélever le train postérieur de la chienne ou utiliser une sonde de type « Osiris » (*figure 1c*) dont le ballonnet gonflable joue le rôle des bulbes érectiles (Mialot et al. 1985).



**Figure 1a :** Particularité anatomique du vagin de la chienne avec sa partie antérieure horizontale et sa partie postérieure verticale.



**Figure 1b :** Pénis du chien en érection : dilatation des bulbes érectiles



**Figure 1c :** Pistolet « Osiris » dont le ballonnet simule les bulbes érectiles dilatés.

## Résultats

**Il est possible d'obtenir 95 % de gestations** avec une proligité normale à la suite d'IA par la voie intra-vaginale, si les conditions suivantes ont été respectées :

- l'IA a été programmée d'emblée, sans tentative d'accouplement naturel préalable,
- le suivi de chaleurs, rigoureux, a bien respecté les étapes que nous avons décrites,
- le sperme est de bonne qualité,
- un suivi post-opératoire permet de corriger certaines anomalies indépendantes de la technique de mise en place de la semence (Farstad 1984 ; Hutchinson 1997).

### Plusieurs causes d'échecs méritent d'être prises en compte.

Il arrive très souvent que l'on soit consulté après plusieurs tentatives de saillies naturelles suivies d'échecs et que l'on doive intervenir un peu tard : la progestéronémie est alors supérieure à 8 ng/ml. Selon le moment de l'intervention par rapport à la date de l'ovulation, alors difficile à apprécier, un certain nombre d'ovocytes peuvent être encore fécondables, et la proligité de la chienne est alors diminuée, ou la totalité ne le sont plus, et l'intervention n'est pas suivie de gestation. L'échec n'est pas lié à la technique de mise en place de la semence mais à une

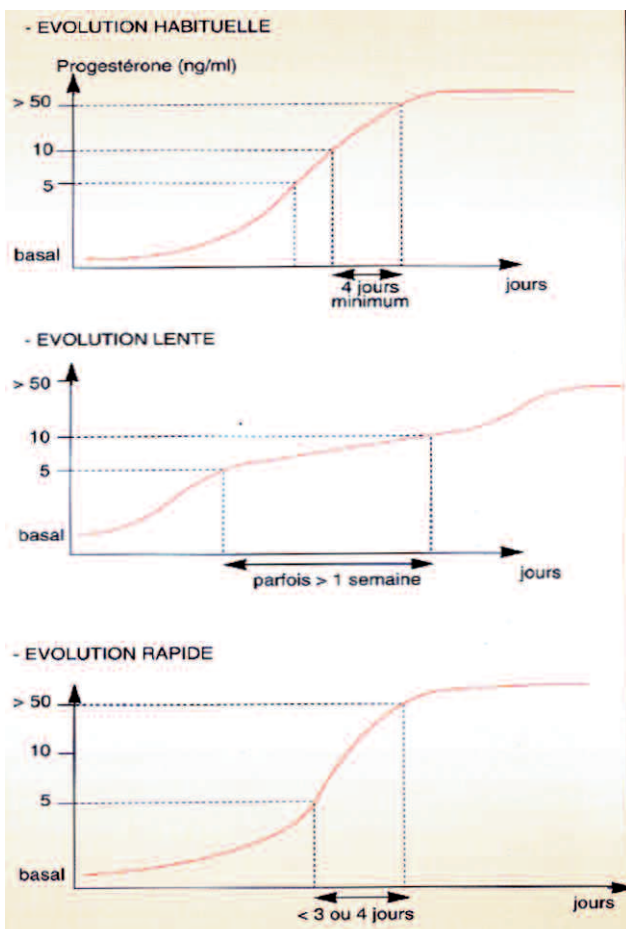
intervention trop tardive ; il aurait été évité par une consultation plus précoce.

Certains praticiens ne font plus de frottis vaginaux et limitent le suivi de chaleurs à des mesures répétées de la progestéronémie. Ils peuvent alors négliger une vaginite qui aurait été diagnostiquée par la présence de leucocytes sur le frottis et qui aurait dû être traitée avant l'IA. Cette affection, le plus souvent asymptomatique, est responsable de 10 à 15 % des cas d'infertilité canine, le milieu vaginal étant dans ce cas cytotoxique pour les spermatozoïdes.

La qualité de la semence est un facteur déterminant du succès de l'IA avec la semence fraîche. Une concentration insuffisante ou une mobilité réduite des spermatozoïdes sont source d'échecs ou de proligité diminuée lorsque l'insémination est pratiquée par voie vaginale ; elles constituent, de notre point de vue, la seule indication de l'IA intra-utérine avec de la semence fraîche. Si on persiste à vouloir utiliser la voie vaginale, il faut concentrer la semence par réfrigération, comme nous le verrons plus loin.

La progestéronémie présente des variations qui peuvent conduire le praticien à intervenir trop tôt. Il est donc judicieux de renouveler sa mesure deux jours après l'IA, pour s'assurer qu'elle a bien augmenté. Si elle marque un palier dans son évolution (*figure 2*, courbe « évolution lente »), il faut réaliser une deuxième IA pour assurer la gestation et/ou une proligité normale.

Enfin, il est également prudent de ne pas attendre le contrôle échographique du vingtième jour après l'insémination pour en vérifier le résultat : une évaluation de la progestéronémie à 10 jours peut permettre de mettre en évidence une insuffisance de la sécrétion de progestérone par les corps jaunes ; cet hypolutéinisme peut être responsable de la résorption des embryons avant leur implantation, ce qui aurait pu être interprété comme un échec de l'IA. Par ailleurs, son diagnostic permet de remédier à cette carence par l'administration orale ou parentérale de progestérone.



**Figure 2 :** Variations possibles de la cinétique de la progestéronémie pendant l'œstrus de la chienne (Fontbonne 1992a).

## INSÉMINATION DE SEMENCE RÉFRIGÉRÉE

(Fontbonne 1992b ; Rota *et al.* 1995)

### Définition

La réfrigération permet de conserver le pouvoir fécondant du sperme de chien pendant quatre jours à 4 °C, alors que le sperme frais doit être utilisé extemporanément. Seule est conservée pour réfrigération la fraction épидидymaire de l'éjaculat, additionnée d'un dilueur spécifique.

### Indications

Elles sont au nombre de trois : lorsque les animaux sont éloignés (insémination à distance), lorsque la semence est de qualité médiocre ou lorsqu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche.



### **Insémination à distance**

La coutume en cynophilie veut que ce soient les chiennes qui rejoignent l'étalon, ce qui implique parfois des déplacements longs et coûteux. La semence peut être prélevée par le vétérinaire du mâle, expédiée par envoi accéléré au vétérinaire de la femelle, qui aura déterminé le moment optimum de la fécondabilité et alerté son confrère. C'est l'indication la plus classique.

### **Concentration de la semence**

Nous avons vu que dans certains éjaculats, les spermatozoïdes étaient en concentration faible et leur mobilité, médiocre. En dehors d'une pathologie testiculaire ou prostatique, cela peut être le cas pour des étalons âgés, intéressants néanmoins par leur potentiel génétique. Il est alors possible de prélever, dans la même journée ou sur deux jours, la fraction épидидymaire de deux ou trois éjaculats : on améliore la qualité initiale de la semence en mélangeant ces fractions, la ou les deux premières ayant été conservées par réfrigération. Toutefois, le sperme ainsi enrichi devra être utilisé sur place et au plus tard après le dernier prélèvement car il ne supporterait pas la conservation habituelle de la semence réfrigérée et *a fortiori* un transport éventuel.

### **Différer une insémination**

Il est fréquent que les éleveurs consultent, après l'échec de la saillie naturelle qu'ils avaient programmée, pour demander une insémination avec de la semence fraîche. Le plus souvent, le choix de la date n'avait pas été déterminé par un suivi de chaleurs correct et la saillie avait été fixée au dixième jour après le début de l'œstrus. Si le praticien se rend compte que la chienne n'a pas encore ovulé et si l'étalon n'est pas disponible les jours suivants, la réfrigération du sperme permettra de conserver celui-ci pendant quatre ou cinq jours au réfrigérateur sans altération de son pouvoir fécondant initial.

### **Préparation de la semence réfrigérée**

Les banques de semence fournissent aux praticiens des dilueurs adaptés à la semence canine, composés de Tris (hydroxyméthyl aminoéthane), d'acide citrique, de fructose auxquels sont ajoutés des antibiotiques. Avant utilisation, il conviendra d'ajouter au dilueur du jaune d'œuf frais dans la proportion de 20 % de jaune d'œuf pour 80 % de dilueur.

Après avoir pris soin de séparer des différentes phases de l'éjaculat au moment du prélèvement et après avoir contrôlé la qualité de la semence par un spermogramme si la semence doit être expédiée, la dilution de la fraction épидидymaire doit être immédiate. Elle est réalisée à température ambiante, en ajoutant le dilueur goutte à goutte et en remuant légèrement le tube contenant la semence. On ajoutera deux à trois millilitres de dilueur dans le cas des races miniatures et 12 à 15 ml dans celui des races de grande taille, avant de répartir le mélange obtenu dans des tubes à hémolyse, fermés par un bouchon en matière plastique, immédiatement mis au réfrigérateur à 4 °C pendant 30 minutes.

### **Utilisation de la semence réfrigérée.**

#### **Insémination à distance**

Le vétérinaire de la chienne effectue le suivi de ses chaleurs et informe le vétérinaire du mâle du moment de l'ovulation. La femelle est fécondable deux jours plus tard et pendant deux jours. Le vétérinaire du mâle prélève le sperme, effectue sa dilution et sa réfrigération ; une heure plus tard, il peut expédier la semence réfrigérée accompagnée d'un spermogramme d'information. L'expédition doit être réalisée dans un emballage spécial permettant de maintenir la température de réfrigération et par courrier rapide de type chronopost.

À la réception du prélèvement, le vétérinaire de la femelle le laisse pendant 30 minutes à la température ambiante si la chienne est sur place ou le met au réfrigérateur si son usage doit être différé. Il contrôle la qualité du sperme avant l'emploi et la compare à celle fournie par le spermogramme initial. Une altération de 5 à 10 % de la motilité et de la concentration des spermatozoïdes est le maximum acceptable pour que l'insémination puisse être réalisée par voie vaginale. Si le sperme a mal supporté le transport, on préférera intervenir par la voie intra-utérine généralement préconisée pour le sperme congelé.

#### **Concentration de la semence**

Si l'étalon donne un éjaculat de mauvaise qualité avec une concentration et une motilité des spermatozoïdes incompatibles avec une insémination de semence fraîche, il est possible de réaliser trois prélèvements dans la journée, de n'en conserver que les fractions épидидymaires, de diluer chacune d'elles dans un volume de dilueur correspondant au tiers du volume total à utiliser et de conserver chaque prélèvement à 4 °C. En fin de journée, les trois prélèvements sont laissés 30 minutes à la température ambiante, puis mélangés. Comme dans le cas précédent, l'insémination sera réalisée par la voie intra-utérine.

#### **Sperme réfrigéré pour utilisation différée**

On doit tenir compte du nombre de jours qu'il aura fallu attendre pour que l'insémination ait lieu au moment de la période de fécondabilité de la chienne, et de la qualité du sperme obtenu une fois réchauffé. On choisira l'insémination par la voie vaginale, si la durée de la réfrigération n'a pas excédé deux jours et par la voie intra-utérine dans le cas où cette durée est dépassée.

### **Résultats**

Lorsque la chienne est inséminée au bon moment, moins de deux jours après la réfrigération d'une semence de bonne qualité, les résultats de l'IA par la voie vaginale sont identiques à ceux obtenus à la suite d'insémination de semence fraîche : on observe de 90 à 95 % de gestations et la prolificité reste conforme à la moyenne de la race.

En revanche, si la semence n'est pas initialement de bonne qualité ou si elle a mal supporté les manipulations ou le transport, il faut avoir recours à l'IA intra-utérine pour augmenter les chances de gestation et s'attendre à une prolificité plus ou moins minorée selon les caractéristiques du sperme inséminé.

### Commentaires

La simplicité de l'IA avec de la semence fraîche en fait, nous l'avons vu, une technique à la portée de tout praticien canin. L'utilisation de la semence réfrigérée, surtout dans son indication la plus classique, l'IA à distance suppose une parfaite maîtrise de la technique par les deux vétérinaires intervenants, leur disponibilité et celle des deux éleveurs. On prendra en compte la compatibilité de la durée du transport avec la conservation de la semence et de tels envois ne doivent pas être réalisés pendant les fins de semaine ou les périodes de retard du courrier.

Tout comme pour l'IA avec de la semence congelée, seuls les vétérinaires ayant suivi un stage de formation d'inséminateur canin, dispensé dans les Écoles vétérinaires de Lyon et d'Alfort et sanctionné par un diplôme, sont habilités en France à pratiquer cette intervention sur les chiennes inscrites au Livre des Origines Français (LOF).

En revanche, les services rendus aux éleveurs sont considérables car le protocole est moins lourd et moins onéreux que pour l'IA avec de la semence congelée, et les résultats sont supérieurs. Les éleveurs sont très demandeurs et la profession ne répond pas suffisamment à leur attente.

## INSÉMINATION DE SEMENCE CONGELÉE

### Définition

Comme chez les animaux de rente, la semence du chien maintenue dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ , conserve son pouvoir fécondant. Congelée en vue de l'insémination artificielle, elle peut être ainsi utilisée plusieurs années après sa récolte.

### Indications

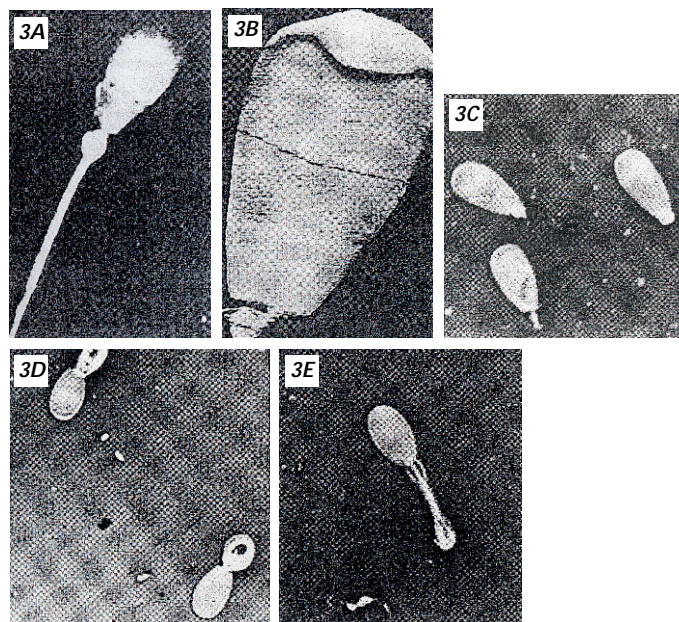
Les indications sont en revanche très différentes car le sperme de chien est peu concentré et la quantité de spermatozoïdes indispensables à une insémination chez la chienne est importante. Il est en outre plus fragile et malgré les progrès réalisés dans la composition des dilueurs de mieux en mieux adaptés à l'espèce, la congélation, puis la décongélation détruisent un grand nombre de gamètes. En définitive, un éjaculat congelé de chien permettra de réaliser deux à quatre inséminations. La technique ne peut donc pas permettre de remplacer la saillie, comme dans l'espèce bovine par exemple, ni de disséminer largement le potentiel génétique d'un étalon exceptionnel.

La semence congelée garde néanmoins de précieuses indications :

- elle permet de préserver la semence d'un étalon de grande qualité, utilisé à des activités dangereuses (chiens d'avalanche, de sauvetage en mer...) ou avant un traitement stérilisant de chimiothérapie par exemple ou en prévention de son vieillissement et *a fortiori*, de son décès. Ainsi les croisements grand-père x petite-fille, fréquemment utilisés en sélection canine, sont grandement facilités, ainsi que d'une façon générale, tous les programmes de sélection : retrempe, progeny-test, etc... ;
- elle permet de sauvegarder des races canines en voie de disparition ;
- elle favorise les échanges internationaux de semence canine sans limitation de délai de transport comme la semence réfrigérée ;
- enfin les banques de semence canine apportent des garanties sanitaires par les contrôles effectués avant la congélation du sperme, concernant la brucellose et les herpès-viroses et, de plus en plus souvent, des garanties génétiques (cartes ADN pour éviter les fraudes et faciliter des recherches éventuelles de paternité).

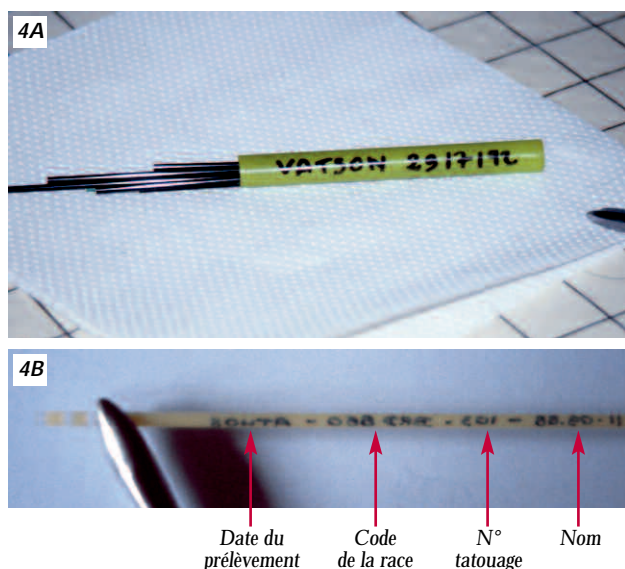
### Préparation de la semence congelée

Comme pour l'insémination de semence réfrigérée, la récolte de sperme est fractionnée et diluée, avec cependant un dilueur différent. Seule une semence d'excellente qualité sera congelée, une fois réalisé un spermogramme qui sera conservé par la banque de semence et qui doit répondre aux critères suivants : concentration de spermatozoïdes supérieure à 400 millions par ml, motilité supérieure à 70 %, pourcentage de cellules anormales inférieure à 20 % (Figure 3).



**Figure 3 :** Exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes, compromettant leur pouvoir fécondant. **Malformations de la tête :** « diadème » et gouttelette cytoplasmique proximale (3A), défaut « knobbed » de l'acrosome (3B) ; **Perte de flagelle (3C) ; Malformations de la queue :** queue enroulée observée dans des cas de tumeurs testiculaires (3D), « dag defect » dans des cas d'épididymite/orchite (3E).

La semence sera ensuite conditionnée en paillettes de 0,25 ml à 0,50 ml, conservées dans des bacs d'azote liquide. Chaque paillette doit contenir de 100 à 120 millions de spz/ml et porter quatre indications : le code de la race, la date du prélèvement, les numéros de tatouage et nom de l'étalon (*Figure 4 A et B*).



**Figure 4 :** Paillettes de semence congelée. Présentation en paquets de six à dix (4A) ; critères d'identification des paillettes (4B).

Toutes les opérations de dilution, congélation et mise en paillettes ne sont pratiquées que dans de centres agréés et par des personnes habilitées à le faire sur le plan légal.

## Utilisation de la semence

### Aspects réglementaires

Le plus souvent, la semence congelée sera utilisée dans les banques de semence, soit par celle qui en a assuré le stockage, soit après réception d'une semence transportée dans un contenant d'azote liquide, en provenance d'une autre banque.

En France, les vétérinaires qui ont obtenu le diplôme d'inséminateur canin sont seuls habilités, en dehors des quatre banques de semence agréées, à recevoir et à utiliser du sperme congelé. S'ils veulent utiliser une semence en provenance d'un pays étranger, ils doivent passer par une banque française pour l'importer (Linde-Forsberg 1995).

### Aspects techniques

La première opération consiste en la décongélation des paillettes contenant la semence, qui est réalisée le plus souvent en les plongeant dans un bain-marie à 37 °C pendant 30 secondes à une minute. La décongélation à haute température, à 70 °C et pendant quelques secondes, est pratiquée par certaines banques.

Après décongélation, la qualité de la semence est comparée au spermogramme établi lors de la récolte. La semence doit présenter au minimum 50 % de spermatozoïdes vivants et très mobiles et présenter moins de 20 % de formes anormales. Elle doit être immédiatement inséminée après décongélation.

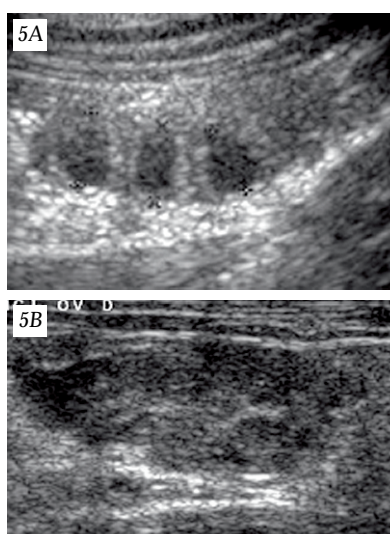
### Insémination proprement dite

Les spermatozoïdes du sperme congelé n'ayant pas la même qualité que ceux du sperme frais ou réfrigéré, l'insémination doit répondre à deux exigences supplémentaires pour pouvoir prétendre au succès :

- la détermination encore plus précise de la fécondabilité de la chienne,
- la mise en place intra-utérine de la semence.

### Contrôle échographique de l'ovulation

Devenu accessible avec les progrès de l'échographie et compte tenu de la définition que l'on peut obtenir avec les appareils récents, il est maintenant possible de suivre la déhiscence des follicules ovariens en réalisant le suivi échographique des ovaires (*Figure 5*), dès que la progestéronémie a atteint le seuil correspondant à l'ovulation de la chienne (Fontbonne *et al.* 2004). Nous avons vu précédemment que la courbe de la progestéronémie pouvait évoluer selon un plateau et que l'on pouvait être amené à renouveler l'insémination. Le plus souvent, lors d'insémination de semence congelée, il était pratiqué deux inséminations à 24 heures d'intervalle pour palier ce risque mais avec l'inconvénient d'utiliser le double de paillettes. L'échographie apporte une solution simple, lourde dans son application, mais gratifiante par l'amélioration des résultats : dès que la progestéronémie atteint 8 ng/ml, on effectue matin et soir une échographie des ovaires et l'on insémine 48 heures après l'ovulation ainsi déterminée avec la plus grande précision possible. La deuxième insémination n'est plus indispensable et une économie de paillettes est ainsi envisageable.



**Figure 5 :** détermination du moment de l'ovulation par le suivi échographique des ovaires : en A, les follicules mûrs sont nettement visibles avant l'ovulation, à comparer avec l'image B, recueillie après l'ovulation.



### **Insémination intra-utérine**

Pendant très longtemps et pratiquement depuis les débuts de l'IA canine, le col utérin de la chienne a été considéré comme infranchissable, compte tenu de sa petite taille et de la position de son ouverture qui n'est pas située au centre de l'extrémité antérieure du vagin, mais en position antéro-supérieure. La semence congelée était inséminée par la voie vaginale : les résultats, médiocres, ne dépassaient pas 30 % de gestations avec une prolificité réduite de 20 à 40 % (Seager 1969).

L'insémination intra-utérine par voie chirurgicale (par laparotomie ou laparoscopie) a permis d'améliorer les résultats mais en limitant le nombre d'interventions (Silva *et al.* 1995).

Un progrès considérable a été réalisé en 1975 avec la mise au point d'un cathéter, le cathéter de Farstad, permettant de franchir le col utérin. Son utilisation implique une certaine dextérité de l'opérateur qui doit d'une main, mobiliser le col de l'utérus par palpation trans-abdominale et de l'autre, en rechercher l'ouverture avec l'extrémité du cathéter introduit dans le vagin (Wilson 1993 ; Linde-Forsberg *et al.* 2001).

Il est très difficile, voire impossible, d'inséminer par cette méthode les chiennes de grandes races ou celles dont la sangle abdominale est très musclée ou infiltrée de graisse, ce qui exclut environ 5 à 10 % des chiennes présentées.

Les résultats publiés sont remarquables puisque selon les auteurs, de 70 % à 80 % de gestations sont obtenues, l'expérience et la dextérité de l'inséminateur expliquant sans doute la différence de pourcentages (Linde-Forsberg 2000) ; ces résultats sont cependant à comparer aux 90 % de gestations consécutives à des inséminations de semence fraîche et ce, indépendamment de la voie utilisée (Silva *et al.* 1996).

Aujourd'hui, la fibroscopie vaginale, qui permet la parfaite visualisation du col, est la méthode de choix et d'avenir car elle facilite grandement le passage du col utérin avec la sonde de Farstad et ne nécessite pas une formation particulière de l'inséminateur ; elle est en outre applicable à toutes les races (Wilson 2003).

### **Commentaires**

#### **Un intérêt croissant des éleveurs et des cynophiles pour l'IA**

Les résultats relativement médiocres obtenus par l'IA avec la semence congelée, pratiquée par voie intra-vaginale, ont très longtemps constitué un frein à son développement. La précision que l'on peut maintenant obtenir dans la détermination de la fécondabilité de la chienne grâce à l'apport de l'échographie ovarienne et la possibilité de réaliser une IA intra-utérine, ont tellement amélioré les résultats que l'intérêt des éleveurs, pour l'IA de semence congelée, augmente de façon exponentielle dans tous les pays où la cynophilie est développée.

Les banques de semence canine se multiplient pour répondre à la demande. Elles sont généralement associées à des facul-

tés vétérinaires mais de plus en plus souvent sont des entreprises privées. Les échanges internationaux de semence congelée, *via* Internet, contribuent largement à l'extension de ce type d'IA.

### **Une réglementation indispensable**

Il est grand temps d'harmoniser la réglementation de ces échanges. Dans certains pays comme l'Italie, il est possible d'importer ou d'exporter de la semence canine sans aucun contrôle.

En France, toute semence importée doit transiter par l'une des quatre banques autorisées qui n'exercent aucun contrôle lorsque la semence provient d'un pays de la CEE mais exigent un permis d'importation délivré par le Service des titres du commerce extérieur.

En Allemagne, il faut une autorisation d'importation délivrée par les clubs de race.

En Espagne, en Autriche, la semence doit être accompagnée d'un certificat garantissant l'étalon indemne de brucellose et de leptospirose.

Au Canada et aux États-Unis, l'étalon doit avoir séjourné, pendant les six mois précédant le prélèvement de semence, dans un pays déclaré indemne de rage depuis au moins 12 mois. Il doit être certifié indemne de brucellose, ne pas avoir reçu de traitement antibiotique dans les 30 jours précédant le prélèvement et ne pas avoir effectué de saillie au cours des 15 derniers jours. La nature du dilueur doit être précisée.

Il règne dans ces échanges l'anarchie la plus totale : la réglementation peut changer d'un moment à l'autre et d'un pays à l'autre et avant toute importation ou exportation, il est impératif de contacter les services compétents de chaque pays. Les sociétés canines, les banques de semence, les associations de vétérinaires spécialisés tentent de clarifier la situation mais sans résultat à ce jour et il serait temps d'y parvenir (Linde-Forsberg 2002).

### **Des applications nouvelles en perspective**

Indépendamment des résultats statistiques, qui seront sans doute encore améliorés à la faveur de nouvelles avancées dans le domaine de la physiologie sexuelle de l'espèce ou dans celui des investigations sémiologiques de l'appareil génital mâle et femelle, les progrès de la génétique canine devraient encore contribuer au développement des banques de semence.

La cartographie des 10 000 gènes du génome canin est actuellement établie et les applications de ces nouvelles données dans les banques de semence devraient permettre, à court terme, une identification génétique des étalons plus précise que le tatouage et les « micro-ships ». L'utilisation de ces techniques de génétique moléculaire devrait aboutir à éliminer toute possibilité de fraude sur les pedigrees et surtout participer à moyen terme à l'éradication de certaines tares ou affections héréditaires dont le gène identifié serait systématiquement recherché dans les races à risque.



Le laboratoire « Génétique et Développement » (UMR CNRS 6061) de l'Université de Rennes s'est intéressé à la génétique du chien ; il a identifié les gènes impliqués dans un certain nombre d'affections telles que l'histiocytose maligne (chez le Bouvier Bernois, le Rottweiler), l'atrophie de la rétine (chez le Border Collie), le phénotype « Merle » (chez le Berger australien, le Colley,...), l'ichtyose du Golden Retriever, l'épilepsie (chez le Grand Bouvier suisse, le Terrier du Tibet), les mélanomes et la dysplasie de la hanche (chez plusieurs races), etc...

La recherche systématique du gène dans les banques de semence permettrait de refuser la semence des sujets porteurs, de prévenir une plus large diffusion de l'affection et accessoirement de contribuer à la construction d'un arbre généalogique du mode de transmission.

Enfin, les résultats que l'on pourrait obtenir chez le chien, dans la mesure où ils seraient susceptibles de transfert à la médecine humaine, ouvriraient des perspectives de recherches particulièrement intéressantes.

## CONCLUSION

L'insémination artificielle de semence fraîche est de mieux en mieux maîtrisée par un nombre croissant de praticiens qui en ont compris l'intérêt ; elle doit devenir un acte de routine à la portée de tout généraliste.

L'insémination de semence réfrigérée n'a pas le développement qu'elle mérite et qu'attendent les éleveurs professionnels et les cynophiles. Il est urgent que de plus en plus de confrères se forment à cette technique.

L'insémination de semence congelée, devenue à la fois plus accessible et plus performante, doit néanmoins rester entre les mains de spécialistes pour ne pas être dévalorisée ; elle devrait trouver des applications prometteuses en cynophilie et pour la recherche fondamentale sur les maladies génétiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- Concannon, P.W. & Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In *Current Veterinary Therapy; Small Animal Practice*, (ed. R. Kirk), pp. 1247-1259 WB Saunders Publ., Philadelphia.
- Concannon, P. W., Mc Cann, J. P., Temple, M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fert. (Suppl.)* 39 : 3-25.
- Concannon, P. W., Whaley, S., Lein, D., Wissler, R. 1983. Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am J Vet Res.* 44 : 1819-1821.
- Dumon, C. 1992 a. Insémination artificielle en semence fraîche. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 243-249, 7508 Paris
- Dumon, C. 1992 b. Frottis vaginaux chez la chienne. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 47-52, 7508 Paris.
- Farstad, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract.* 25 : 561-565.
- Fontbonne, A. 1992 a. Utilisation du dosage de la progestéronémie chez la chienne. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 54-58, 7508 Paris.
- Fontbonne, A. 1992 b. Insémination artificielle en semence réfrigérée et congelée chez la chienne. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 260-264, 7508 Paris.
- Fontbonne, A. & Dumon, C. 1992. Prélèvement et examen de la semence chez le chien In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 252-260, 7508 Paris.
- Fontbonne A. & Chastant S. 2004. Ovulation diagnosis attempt using ovarian ultrasonography. In *Proceedings of European Congress Barcelona*, (ed. EVSSAR), pp. 58-64.
- Hutchinson, R. V. 1997. Maximizing conception rates using fresh cooled or frozen canine semen. In *Proceedings of the canine Male Reprod Symposium*, september pp. 61-70.
- Jeffcoate, IA & Lindsay, FE. 1989. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fert. (suppl)* 39 : 277-287.
- Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Vet Med Surg (Small Animal)* 10 : 48-58.
- Linde-Forsberg, C. 2000. Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in the dog. In *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Oslo, p. 120.
- Linde-Forsberg, C. 2001. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In *Recent advances in small Animal Reproduction* (ed. P.W. Concannon & J. Verstegen), A1207.0201. England GCW, Ithaca: international Veterinary information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).
- Linde-Forsberg, C. 2002. Regulaciones y recomendaciones para el envío internacional de semen canino enfriado y congelado. In *Recent advances in small Animal Reproduction* (ed. P.W. Concannon & J. Verstegen), A1232.1203. England GCW, Ithaca: international Veterinary information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).
- Linde-Forsberg, C. & Forsberg, M. 1993. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fert. (Suppl.)* 47 : 313-323.
- Mialot, J.P. & Guérin, Ch. 1983. Données pratiques de physiologie sexuelle dans l'espèce canine. *Prat Med Chir Anim Comp.* 18 : 5-9.
- Mialot, J. P., Dumon, C., Cassou, B. 1985. Insémination artificielle chez la chienne : mise en place de la semence fraîche avec le pistolet souple "Osiris". *Prat Med Chir Anim Comp.* 20 : 213-219.
- Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44(6) : 885-900.
- Seager, S.W.J. 1969. Successful pregnancies utilising frozen dog semen. *AIDigest.* 17 : 6-16.
- Silva, L.D.M, Onclin, K., Snaps, F., Verstegen, J.P. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43 : 615-623.
- Silva, L.D.M, Onclin, K., Lejeune, B., Verstegen, J. P. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The veterinary Record* 138 : 154-157.
- Wilson, MS. 1993. Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fert. (Suppl.)* 47 : 307-311.
- Wilson, M. 2003. Trans-cervical endoscopic insemination in bitches. In *Recent advances in small Animal Reproduction* (ed. P.W. Concannon & J. Verstegen), A1232.1203. England GCW, Ithaca: international Veterinary information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

